Darstellung und proteinchemische Untersuchungen an den zwei Komponenten des Tectins A (Spectrin) aus der Plasmamembran menschlicher Erythrozyten.

Vorgelegt

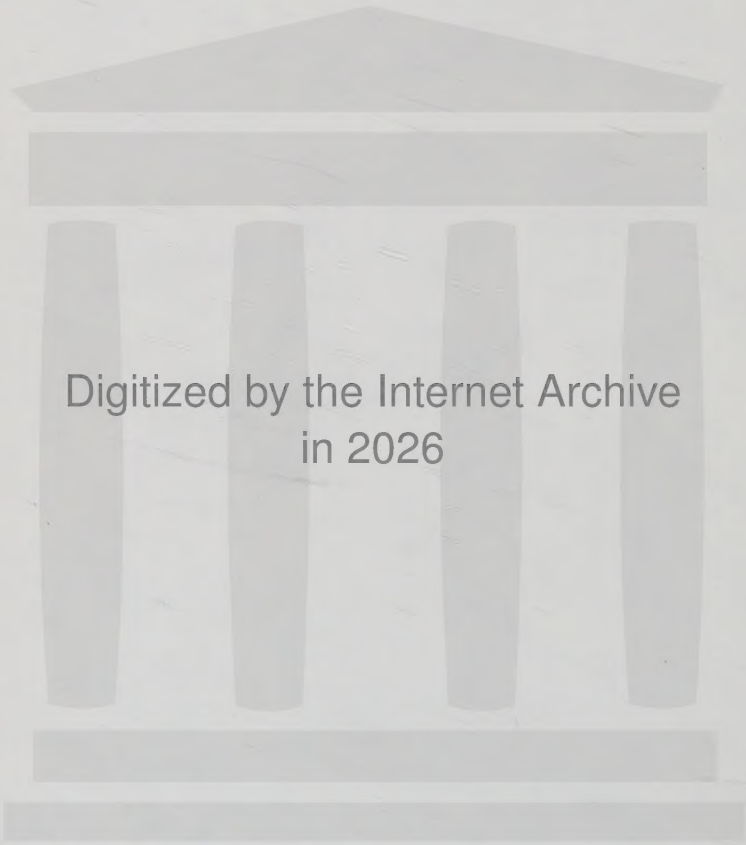
von

Horst Hirschfelder

aus

Erlangen

1974 № 389


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41540301_0002

Aus dem I. Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. W. Kersten

Darstellung und proteinchemische Untersuchungen an den zwei Komponenten des Tectins A (Spectrin) aus der Plasmamembran menschlicher Erythrozyten.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt
von
Horst Hirschfelder
aus
Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin der
Universität Erlangen-Nürnberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

komm. Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. H.-J. Horstmann
Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 1974

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung S. 3

II Material und Methoden

1) Präparation der Erythrozyten-membran ('Ghosts') S. 5
a) modifiziert nach Dodge et al. S. 5
b) nach Fairbanks et al. S. 7
2) Analytische Polyacrylamid-Gel-elektrophoresen
a) Essigsäure-Harnstoff-System S. 9
b) SDS-System S. 1o
3) Gelfiltration S. 11
4) Präparative Polyacrylamid-Gel-elektrophoresen
a) 'slicing'-Methode S. 11
b) im UltraPhor (Colora) S. 14
- pH 3 - System S. 15
- SDS - System S. 16
5) Molekulargewichtsbestimmung S. 17
6) Aminosäure-Analyse S. 18
7) Bromcyan-Spaltung S. 19
8) Tryptische Spaltung und Trennung der dabei entstandenen Peptide S. 19

III Ergebnisse

A) Proteintrennung

1) Gelfiltration S. 21

2) Trennungsversuche mit der 'slicing'-Methode S. 22
3) Isolierung mittels Durchfluß-elektrophorese im pH3-System S. 24
4) Isolierung mittels Durchfluß-elektrophorese im SDS-System S. 25

B) Proteinchemische Untersuchungen

1) Molekulargewichtsbestimmung S. 3o
2) Aminosäure-Zusammensetzung S. 32
3) Bromcyan-Spaltung S. 33
4) Tryptische Spaltung und Trennung der dabei entstandenen Peptide S. 35
5) Lösungsverhalten von Tectin A1 und A2 und das Auftreten der Doppelbande in der Gelelektrophorese S. 37

IV Diskussion S. 39

V Zusammenfassung S. 5o

VI Literaturübersicht S. 51

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

SDS = Sodium-Dodecyl-Sulfate
EDTA = Ethylene-Diamine-Tetra-Acetate
Bis = N,N'-Methylenbisacrylamid
DTE = Dithioerythritol

I Einleitung

Seit den Anfängen der Membranforschung waren die Membranen der menschlichen Erythrozyten ein beliebtes Forschungsobjekt: Es ist hier möglich, mit einer einzigen Art von Membran zu arbeiten, die mit keiner anderen biologischen Membran verunreinigt ist.

Nach ersten Untersuchungen an den Lipiden der Erythrozytenmembran interessierte bald auch der Proteinanteil. Entsprechend der Löslichkeit in einer o.oo5 M EDTA-Lösung wurden die Proteine in eine wasserlösliche und in eine wasserunlösliche Fraktion eingeteilt (1,2,3).

Innerhalb der Gruppe der wasserlöslichen Proteine fiel bald auf, daß in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Natrium-Dodecyl-Sulfat-haltigen Puffersystemen zwei Proteine zu finden sind, die eine charakteristische Doppelbande mit einem Molekulargewicht von 2oo ooo bis 25o ooo Dalton bilden. Sie erhielten von den verschiedenen Autoren verschiedene Namen: Marchesi et al. beschrieben das 'Spectrin' (4,5). Clarke bezeichnete sie als 'Tectin Aα und α'' (6). Mazia et al. hatten den Begriff des 'Tectin' bereits früher für Strukturproteine der Erythrozytenmembran eingeführt (1). Hulla et al. vermuteten (7) und Fuller et al. bewiesen auf Grund eines Aminosäuren-Vergleichs und auf Grund immunologischer Kreuzreaktionen (8), daß es sich bei 'Spectrin' und 'Tectin A' um diesselben Proteine handeln muß. Fairbanks et al. nannten sie 'Fraktion I und Fraktion II' (3). Anselstetter bezeichnete die bei der zweidimen-

sionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Membranproteine der menschlichen Erythrozyten erhaltenen Banden, welche dem 'Tectin A' entsprechen, mit A1 und A2 (9).

In dieser Arbeit soll für diese beiden Proteine der Name 'Tectin A1 und A2' benutzt werden.

Über die Eigenschaften von Tectin A1 und A2 ist bisher nur wenig bekannt: Das Molekulargewicht zwischen 2oo ooo und 25o ooo Dalton wurde von mehreren Autoren bestimmt (3,9,1o,11,12,13). Es wurden auch einige Analysen über die Aminosäure-Zusammensetzung durchgeführt (1,5,8,14). Die Bestimmung der N-terminalen Gruppe ergab kein einheitliches Ergebnis (8,15). Zu der Frage, ob die Tectine A1 und A2 einen Kohlenhydratanteil besitzen, liegen unterschiedliche Informationen vor (6,16;9). In der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte sich eine Aufgliederung von Tectin A2 in drei Komponenten (9). Steck bestimmte die Lage von Tectin A1 und A2 an der Innenseite der Erythrozytenmembran (17).

Weitergehende proteinchemische Untersuchungen an voneinander getrenntem Tectin A1 und Tectin A2 waren bisher nicht möglich, da ein geeignetes Präparationsverfahren fehlte, um beide Proteine einzeln in genügend großen Mengen zu gewinnen.

Aufgabe dieser Arbeit war es, ein geeignetes Präparations- und Isolationsverfahren für Tectin A1 und A2 zu finden und an den so gewonnenen Einzelproteinen proteinchemische Untersuchungen durchzuführen.

II Material und Methoden

II/1 Präparation der Erythrozytenmembran ('Ghosts')

Zur Gewinnung von Membranproteinen wurden Blutkonserven verschiedener Spender mit verschiedenen Blutgruppen und Rhesus-Faktoren aufgearbeitet. Die Blutbank der Chirurgischen Universitätsklinik in Erlangen stellte freundlicherweise Blutkonserven zur Verfügung, die seit Entnahme länger als 3o Tage bei + 4°C gelagert waren.

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Präparationsschritte bei + 4°C durchgeführt.

II/1/a Schema zur Präparation nach Dodge et al., erweitert und modifiziert (18)

Konservenblut 5oo ml
↓
+ 5oo ml 31o mosmol Na-Phosphat-Puffer pH 7.3
2o Minuten zentrifugieren bei 6 ooo g
absaugen von Serum und Leukozyten
Sediment = Erythrozyten
↓
+ 31o mosmol Na-Phosphat-Puffer pH 7.3 ad 1 ooo ml
2o Minuten zentrifugieren bei 6 ooo g
Vorgang zweimal wiederholen
Sediment = gewaschene Erythrozyten
↓
+ 2 ooo ml 2o mosmol Na- Phosphat-Puffer pH 7.3
3o Minuten hämolysieren lassen bei + 2o°C
1o Minuten zentrifugieren bei 25 ooo g

Sediment = Ghosts

↓ waschen in 2o mosmol Na-Phosphat-Puffer pH 7.3
1o Minuten zentrifugieren bei 48 ooo g
Vorgang ca. sechsmal wiederholen, bis das Sediment weißlich ist

Sediment = gewaschene Ghosts

↓ 24 Stunden Dialyse gegen 5 ooo ml o.ooo5 M EDTA, o.o2% 2-Mercaptoäthanol (pH9 mit NH_3 eingestellt)
6o Minuten zentrifugieren bei 7o ooo g

Überstand = wasserlösliche Proteine

↓ mit Essigsäure auf pH 4.5 einstellen
1o Minuten zentrifugieren bei 12 ooo g

Sediment = wasserlösliche, bei pH 4.5 fällbare Proteine

↓ lösen in 1o ml H_2O (pH 1o mit NH_3 eingestellt)
+ $(NH_4)_2SO_4$ bis o.9 M, sieben Stunden bei + 2o°C stehen lassen
1o Minuten zentrifugieren bei 2 2oo g

Sediment = Ausgangsmaterial für die Trennungsversuche zur Isolierung von Tectin A1 und A2 (siehe Abb.1)

Die auf diese Weise gewonnene Proteinsuspension wurde über fünf Tage gegen destilliertes Wasser, das mit Ammoniak auf pH 9 eingestellt worden war, bei halbtägigem Wechsel des Wassers dialysiert und anschließend lyophilisiert.

II/1/b Schema zur Präparation nach Fairbanks et al. (3)

Konservenblut 5oo ml
↓ + 5oo ml o.15 M NaCl, o.oo5 M EDTA, o.oo5 M Na-Phosphat-Puffer pH 8
15 Minuten zentrifugieren bei 2 5oo g
absaugen des Serums und der Leukozyten
Sediment = Erythrozyten
↓ suspendieren in o.15 M NaCl, o.oo5 M EDTA, o.oo5 M Na-Phosphat-Puffer pH 8
1o Minuten zentrifugieren bei 2 5oo g
Vorgang zweimal wiederholen
Sediment = gewaschene Erythrozyten
↓ hämolysieren durch langsames Eintropfen der gewaschenen Erythrozyten in 1 1oo ml o.oo5 M Na-Phosphat-Puffer pH 8 unter ständigem Rühren
15 Minuten zentrifugieren bei 25 ooo g
Sediment = Ghosts
↓ suspendieren in 1 2oo ml o.oo5 M Na-Phosphat-Puffer pH 8
2o Minuten zentrifugieren bei 2o ooo g
Vorgang ca. dreimal wiederholen, bis das Sediment weißlich ist, dann
15 Minuten zentrifugieren bei 68 ooo g
Sediment = gewaschene Ghosts
↓ im Verhältnis 1:9 (v:v) mit o.ooo1 M EDTA pH 8 verdünnen und 2o Minuten bei 37°C rühren
45 Minuten zentrifugieren bei 68 ooo g
Überstand = wasserlösliche Proteine = Ausgangsmaterial für die Trennungsversuche zur Isolierung von Tectin A1 und A2 (siehe Abb. 1)

Die so gewonnene Proteinsuspension wurde wie auf Seite 6 beschrieben weiterbehandelt.

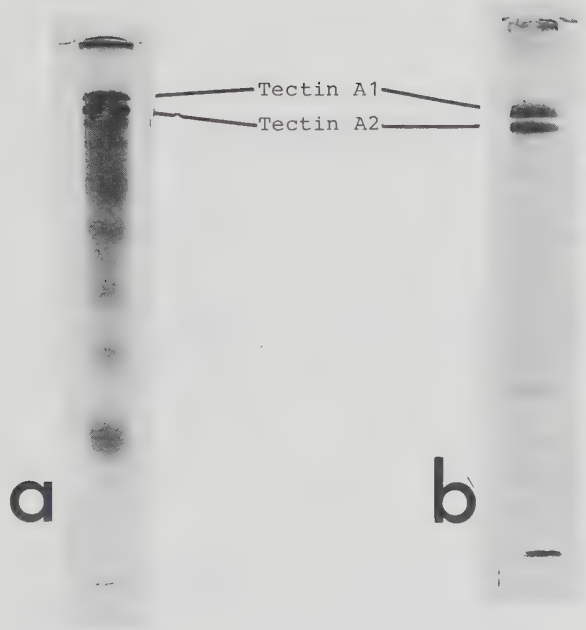


Abb. 1: Ausgangsmaterial für die Trennungsversuche zur Isolierung von Tectin A1 und A2

a) Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese im pH3-System (ohne SDS) der wasserlöslichen, bei pH 4.5 gefällten und mit Ammoniumsulfat-Fällung extrahierten Proteine der Erythrozytenmembran (Präparation nach Dodge, siehe II/1/a)

b) Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese im SDS-System der wasserlöslichen Proteine der Erythrozytenmembran (Präparation nach Fairbanks, siehe II/1/b)

II/2 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

a) Essigsäure-Harnstoff-System pH 3 ohne SDS (nach Busse und Horstmann, unveröffentlicht)

Es wurde mit folgenden Pufferlösungen gearbeitet:

	Anoden-puffer	Kathoden-puffer	Gel-puffer	Inkubations-puffer
Essigsäure %(v:v)	1o	1o	3o	3o
Harnstoff M			6	6
Acrylamid %(g:v)			5	
Bis %(g:v)			o.15	
2-Mercapto-äthanol %(v:v)				1o
pH	2.3	2.3	3.1	3.1

Die Probenlösung wurde 2 bis 24 Stunden bei + 2o°C inkubiert.
Für die Gelröhrchen (o.6 x 6 cm) wurden folgende Elektrophoresebedingungen eingehalten:

1o Minuten lang 2 mA/Gelröhrchen, dann
2oo - 24o Minuten lang 4 mA/Gelröhrchen

Die Gele wurden anschließend mit Amidoschwarz (1% in 3o% Methanol und 7% Essigsäure) angefärbt. Der nicht an Protein gebundene Farbstoff wurde durch Waschen der Gele in 7% Essigsäure entfernt.

b) SDS - System nach Fairbanks et al. (3)

Es wurde mit folgenden Pufferlösungen gearbeitet:

		Anoden-puffer	Kathoden-puffer	Gel-puffer	Inkubations-puffer
Tris	M	o.o4	o.o4	o.o4	o.o1
Na-Acetat	M	o.o2	o.o2	o.o2	
EDTA	M	o.oo2	o.oo2	o.oo2	o.oo1
SDS	%(g:v)	1	1	1	1
DTE	M				o.o4
Acrylamid	%(g:v)			5	
Bis	%(g:v)			o.1	
pH		7.4	7.4	7.4	8.o

Die Probenlösung wurde 2 Stunden bei + 37°C inkubiert. Für die Gelröhrchen (o.6 x 7 cm) wurden folgende Elektrophoresebedingungen eingehalten:

1o Minuten lang 2 mA/Gelröhrchen, dann

9o - 12o Minuten lang 6 mA/Gelröhrchen.

Die Gele wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau (o.25% in Methanol:H_2O:Essigsäure=5o:5o:1o=v:v) angefärbt. Der nicht an Protein gebundene Farbstoff wurde durch Waschen der Gele in Methanol:H_2O:Essigsäure=5o:1ooo:75 (v:v) entfernt.

II/3 Gelfiltration

Eine Säule (2.5 x 1oo cm) wurde mit Biogel P 2oo (Bio-Rad Laboratories, 1oo - 2oo mesh) gefüllt und mit H_2O (mit NH_3 auf pH 9 eingestellt) äquilibriert. Der freie Durchfluß betrug 7 ml/Stunde.

Zur Trennung wurden etwa 15 mg Protein eingesetzt, das wie in Teil II/1/a beschrieben, allerdings ohne den letzten Schritt der Ammoniumsulfat-Fällung gewonnen wurde.

Die Lösung (etwa 3 ml) wurde auf das Gelbett aufgetragen und mit H_2O (mit NH_3 auf pH 9 eingestellt) eluiert. Es wurden 2 ml-Fraktionen gesammelt (Ultro-Rac, LKB), deren Extinktion bei der Wellenlänge 254 nm fortlaufend registriert wurde (Uvicord,LKB).

Nach dem Ergebnis des Elutionsdiagrammes wurden benachbarte, proteinhaltige Fraktionen vereinigt, lyophilisiert und durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese im SDS-System analysiert.

II/4 Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

a) nach der 'slicing'-Methode

Bei der 'slicing'-Methode wurden die Proteine wie bei der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese solange der Elektrophorese unterworfen, bis die einzelnen Banden genügend weit voneinander getrennt

waren. Durch Ausschneiden und Anfärben von drei Referenzstreifen aus dem Gelblock (16o x 16o x 6 mm, Ultraphor Colora) konnte die Lage der gesuchten Proteine Tectin A1 und A2 bestimmt werden (siehe Abb. 2).

Die auf diese Weise georteten Banden wurden mit Rasierklingen aus dem noch ungefärbten Gelblock ausgeschnitten. Die proteinhaltigen Gelstreifen wurden zwischen zwei Glasplatten durch Quetschen homogenisiert. Anschließend folgte die Elution der Proteine durch 24-stündiges Rühren des Gelbreis in einer o.25% NH_3-Lösung. Nach Abzentrifugieren der Gelpartikel wurde der Überstand fünf Tage gegen o.25% NH_3-Lösung dialysiert und danach lyophilisiert.

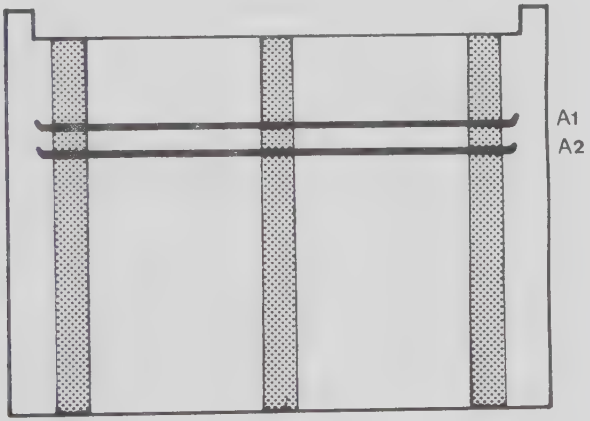


Abb. 2: Schematische Darstellung der 'slicing'-Methode

Nach der Elektrophorese wurden aus dem Gelblock drei Referenzstreifen (schraffiert) herausgeschnitten und mit Amidoschwarz gefärbt. Die dadurch georteten Banden des Tectin A1 und A2 wurden aus dem ungefärbten Gelblock herausgeschnitten und zur Wiedergewinnung der Proteine eluiert (siehe Text).

Für die Durchführung der 'slicing' -Methode erwiesen sich folgende Pufferlösungen als günstig:

	Anoden-puffer	Kathoden-puffer	Gel-puffer	Inkubations-puffer
Essigsäure %(v:v)	1o	1o	3o	3o
Harnstoff M			6	6
2-Mercapto-äthanol %(v:v)				1o
Acrylamid %(g:v)			5	
Bis %(g:v)			o,1	
pH	2,3	2,3	3,1	3,1

Pro Versuch wurden etwa 1o - 15 mg Protein, das nach der in Teil II/1/a beschriebenen Methode gewonnen war, eingesetzt. Die Probenlösung wurde in 1o ml Inkubationspuffer 15 Stunden lang bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 2o ooo g zentrifugiert.

Für die vertikalen Gelplatten (16o x 16o x 6 mm) im UltraPhor (Colora) wurden folgende Elektrophoresebedingungen eingehalten:

3o Minuten lang 3o mA (ca. 6o V), dann

1 Stunde lang 5o mA (ca. 9o V), dann

42 Stunden lang 8o mA (ca. 15o - 25o V).

Zur Kontrolle des Trennergebnisses schloß sich eine in Teil II/2/a beschriebene Polyacrylamid-Gelelektrophorese an.

III/4/b Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese im UltraPhor (Colora)

Bei der von Schmidt und Nees beschriebenen Methode der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (19) wurde mit vertikalen Gelplatten (14o x 4o x 8 mm) gearbeitet. Die Proteine trennen sich wie bei der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend Molekulargewicht, Molekülform und Ladungszustand. Bei Anwesenheit von SDS brauchen native Molekülform und Eigenladung nicht berücksichtigt zu werden.

Zum Unterschied zu der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der der Stromfluß unterbrochen wird, bevor das am schnellsten wandernde Protein das Gel verlassen kann, wird bei der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis die einzelnen, im Gel getrennten Proteine am unteren Rand des Gels in den Pufferraum auswandern (sog. Durchflußelektrophorese - 2o).

Um diese auswandernden Proteine sammeln zu können, wird der untere Gelrand in einer kleinen Elutionskammer mit Elutionspuffer gespült. Zur Abgrenzung der Elutionskammer gegen den Elektrodenpufferraum wird eine semipermeable Membran (z.B. ein Dialyseschlauch) unter der Elutionskammer befestigt. So ist es möglich, die ausgewanderten Proteine, in einem kleinen Volumen an Elutionspuffer gelöst, zu sammeln. Durch Auswahl einer geeigneten Ionenstärke des Elutionspuffers kann infolge der damit erreichten Erhöhung der Feldstärke im unteren Bereich des Trenngels eine Konzentrierung der isolierten Proteine erreicht werden (19).

Die im Elutionspuffer gelösten Proteine werden anschließend photometrisch geortet, fraktioniert und durch analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf ihre Reinheit hin überprüft.

-- Präparative Gelelektrophorese im pH3-System

Für die Durchführung der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese im pH3-System erwiesen sich folgende Pufferlösungen als günstig:

	Anodenpuffer	Kathodenpuffer	Gelpuffer	Elutionspuffer	Gegenkammerpuffer	Inkubationspuffer
Essigsäure %(v:v)	1o	1o	3o	7.5	1o	3o
Harnstoff M			6	2	4	6
2-Mercapto-äthanol %(v:v)						1o
Acrylamid %(g:v)			5			
Bis %(g:v)			o.1			
pH	2.3	2.3	3.1	3.o	3.o	3.1

Pro Versuch wurde etwa 35 mg Protein, das nach der in Teil II/1/a beschriebenen Methode gewonnen war, eingesetzt. Die Probenlösung wurde in 1o ml Inkubationspuffer 12 bis 36 Stunden bei + 2o° oder 37°C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 2o ooo g zentrifugiert.

Es wurden folgende Elektrophoresebedingungen eingehalten:

3o Minuten lang 3o mA, dann

1 Stunde lang 5o mA, dann

23 Stunden lang 8o mA, dann

48 Stunden lang 1oo mA

Fraktionen wurden entsprechend der Extinktion bei 254 nm (Uvicord I,LKB) gesammelt, dialysiert und lyophilisiert. Zur Kontrolle des Trennergebnisses schloß sich eine in Teil II/2/a beschriebene analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese an.

-- Präparative Gelelektrophorese im SDS-System

Für die Durchführung der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese im SDS-System erwiesen sich folgende Pufferlösungen als günstig:

	Anodenpuffer	Kathodenpuffer	Trenngelpuffer	Sammelgelbuffer	Elutionspuffer	Gegenkammerpuffer	Inkubationspuffer	Probenschutzlösung	
Tris	M	o.o4	o.o4	o.o4	o.o1	o.o2	o.o6	o.o1	o.o1
Na-Acetat	M	o.o2	o.o2	o.o2	o.oo5	o.o1	o.o3		
EDTA	M	o.oo2	o.oo2	o.oo2	o.oo05	o.oo2	o.oo4	o.oo1	o.oo1
Harnstoff	M			2	2			2	o.5
DTE	M							o.o4	
SDS	%(g:v)	1	1	1	1	o.1	o.1	1	1
Acrylamid	%(g:v)			4	4				
Bis	%(g:v)			o.o8	o.o8				
pH		7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	8.o	8.o

Pro Versuch wurde etwa 1o bis 15 mg Protein, das nach der in Teil II/1/b beschriebenen Methode gewonnen war, eingesetzt. Es wurde mit Mikrospateln mechanisch zerzupft und in 1 ml 1o M Harnstoff gegeben. Dabei nahm es eine gallertige Konsistenz an. Hierzu wurde der Inkubationspuffer vermischt, wobei das Volumen so klein wie möglich gehalten wurde (üblicherweise 5 ml). Zur Inkubation wurde das Gemisch 2 Stunden unter gelegentlichem Schütteln in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Die Lösung erschien danach reichlich opaleszent, gelegentlich waren noch kleine nicht gelöste

Bestandteile enthalten. Deshalb schloß sich eine Zentrifugation bei 32 ooo g über 2o Minuten an. Um eine mögliche Aggregation der Proteine zu vermeiden, wurde dabei nicht gekühlt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig mit einer 5 ccm-Spritze aspiriert, mit Pyronin G versetzt und unter die Probenschutzlösung in die Starttasche des Geles aufgetragen.

Nach einer Reihe von Voruntersuchungen stellten sich folgende Elektrophoresebedingungen als vorteilhaft heraus:

3o Minuten lang 3o mA (ca. 3o V), dann
1 Stunde lang 5o mA (ca. 5o V), dann
22 1/2 Stunden lang 1oo mA (ca. 1oo - 12o V)

Die Elutionsflüssigkeit mit den eluierten Proteinen wurde in 3 ml-Proben gesammelt. Der Elutionsfluß wurde auf 2o - 25 ml / Stunde begrenzt, um eine bessere Konzentrierung der eluierten Proteine zu erreichen.

Zur Kontrolle des Trennergebnisses schlossen sich zahlreiche analytische Polyacrylamid-Gelelektrophoresen an, die in Teil III/A/4 ausführlich geschildert werden.

II/5 Molekulargewichtsbestimmung

Es wurde die Methode von Weber und Osborn (21) im o.15 M Na-Phosphat-SDS-System angewandt.

Als Standard für die Bestimmung des Molekulargewichts wurde das Albumin vom Rind und dessen Polymere benutzt. Das Molekulargewicht des Rinder-

albumins wird mit 67 ooo Dalton angegeben (Molekulargewichts-Bestimmungssatz von Boehringer Mannheim), dementsprechend ergeben sich für das Dimer 134 ooo, für das Trimer 2o1 ooo, und für das Tetramer 268 ooo Dalton.

Zum Teil wurden die Tectine A1 und A2 im Gemisch mit Albumin aufgetragen, zum Teil wurde die 'Splitgel'-Technik angewandt.

Die Auswertung erfolgte durch Ausmessung der gefärbten Proteinbanden und Umrechnung auf die Wanderungsstrecke des Albuminmonomers. Diese Werte wurden auf ein halblogarithmisches Millimeterpapier aufgetragen und die Ergebnisse graphisch abgelesen(siehe Abb. 9).

II/6 Aminosäure-Analyse

Es wurden o,5 bis 2 mg des nach III/A/4 gewonnenen lyophilisierten Proteinmaterials in 25o - 1ooo µl 6 N HCl gelöst und 24 bzw. 48 Stunden bei 1o5°C in einem zugeschmolzenen Glasröhrchen unter N_2 hydrolysiert. Der im Exsikkator unter Vakuum getrocknete Rückstand wurde in 75o µl Na-Citrat-Puffer pH 2,2 gelöst und auf die Säule eines automatischen Aminosäure-Analysators (Biocal 2oo) aufgetragen.

II/7 Bromcyan-Spaltung

Nach der von Steers et al. beschriebenen Methode (22) wurden in einem 4o ml-Kolben unter N_2-Atmosphäre 8 mg nach III/A/4 gewonnenes Proteinmaterial gegeben und mit 2 ml 7o% Essigsäure und 8o mg BrCN in Substanz versetzt. Nach 24 Stunden bei +2o°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1o ml H_2O gestoppt, das Gemisch bei -17°C eingefroren und lyophylisiert.

Das Spaltungsergebnis wurde in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

Zur Kontrolle wurden weitere Proteinproben unter identischen Bedingungen behandelt, jedoch ohne Zugabe von BrCN.

II/8 Tryptische Spaltung und Trennung der dabei entstandenen Peptide

Es wurde nach der von Horstmann und Gürtler beschriebenen Methode (23) gearbeitet: Zu o,5 - 2 mg des nach III/A/4 gewonnenen Proteinmaterials wurde Trypsin (TPCK-behandelt, Serva) im Verhältnis 1:1o bis 1:2o in einem o,1 M $(NH_4)_2CO_3$-Puffer zugegeben. Die Hydrolyse dauerte 5 Stunden. Anschließend wurde die Enzymaktivität durch kurze Erhitzung auf +7o°C gestoppt und ungelöste Bestandteile durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand wurde im Exsikkator getrocknet.

Der Rückstand wurde als wäßrige Lösung auf eine Polygram Sil G Fertigplatte (4o x 2o cm, Schichtdicke o,25 mm Kieselgel, Firma Machery & Nagel) aufgetragen. Die ein Zentimeter lange Startlinie lag in der Mitte der Längsseite, 2,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt.

Die Hochspannungselektrophorese dauerte drei Stunden bei 3o bis 36 mA und ca. 1 ooo V im System Pyridin:Eisessig:H_2O=1o:2:88 (v:v)(Pherograph Original Frankfurt, Firma Hormuth und Vetter).

Nach Trocknung der Platten bei + 8o°C folgte eine zweifache, aufsteigende Chromatographie im System n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H_2O=34o:2oo:7o:125 (v:v) mit Zwischentrocknen (15 Minuten, + 8o°C).

Zur Anfärbung der Peptide wurde o,3% Ninhydrin in n-Butanol:Eisessig:H_2O=1oo:3:1 (v:v) verwendet.

III Ergebnisse
A) Proteintrennung

III/A/1 Gelfiltration

Nach den Ergebnissen der von Clarke auf Biogel P 3oo durchgeführten Gelfiltration (6) sollte die Trennung von Tectin A1 und A2 mit Biogel P 2oo versucht werden. Ausgangsmaterial für diese Trennungsversuche war das nach II/1/a hergestellte Proteingemisch, allerdings ohne den letzten Schritt der Ammoniumsulfat-Fällung.

Das Proteingemisch löste sich sehr gut in Wasser, das mit Ammoniak auf pH 9 eingestellt war. Es erschien deshalb aussichtsreich, eine Trennung ohne die Zugabe weiterer Elektrolyte zu unternehmen.

Entgegen ähnlichen Versuchen mit anderen Membranproteinen (24) fiel das Protein nicht bereits am Start sichtbar aus.

Entsprechend der bei der Wellenlänge 254 nm gemessenen Extinktion wurden ca. 7 Fraktionen gewonnen, die nach Lyophilisierung ein Trockengewicht von je o.5 - 2.5 mg Protein enthielten.

Die analytische Überprüfung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab allerdings keine Auftrennung der Banden, nicht einmal eine Anreicherung von Tectin A1 und A2.

Trotz der guten Lösungseigenschaften der Tectine in ammoniakalischem Wasser ist die hier angewandte Methode der Gelfiltration für die Trennung ungeeignet. Das Verfahren wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

III/A/2 Trennungsversuche mit der 'Slicing'-Methode

Beim zweiten zur Trennung der Tectine A1 und A2 geprüften Verfahren, der 'slicing'-Methode, zeigte sich bei der Inkubation, daß die Proteine eine gallertige Konsistenz annahmen. Erst nach 24-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur löste sich das Protein bis auf einen kleinen Rest. Auch nach Veränderungen der Inkubationsbedingungen blieb immer ein kleiner Rest von unlöslichem Material übrig. Er wurde durch hochtouriges Zentrifugieren entfernt; Versuche mit diesem abzentrifugierten, nicht löslichen Proteingemisch zeigten in der analytischen

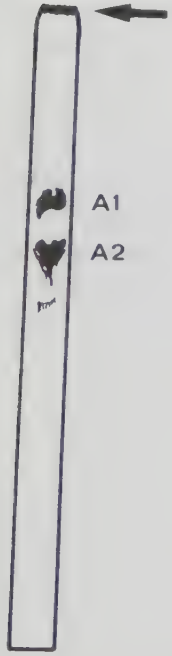


Abb. 3: Querschnitt durch eine nach II/4/a hergestellte Gelplatte nach Elektrophorese und Färbung der Proteinbanden

In diesem nach einem Foto gezeichneten Schema ist deutlich die Verziehung der Proteinbanden zu erkennen, die durch das am Start ausgefallene Protein (Pfeil) verursacht war.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach II/2/a vermehrte Ausfällungen an der Startstelle, sonst aber ein normales Bandenmuster.

Doch auch bei dem gelösten Proteinanteil fiel regelmäßig Protein an der Startstelle aus, was sich schon während des Laufes als Krustenbildung bemerkbar machte. Nach Anfärbung des Gels zeigte sich ein sehr intensiv gefärbter Oberrand des Gels.

Durch dieses am Start ausgefallene Protein wurden die elektrophoretischen Bedingungen so stark verändert, daß die Proteine nicht mehr als parallele Banden wanderten (siehe Abb. 3).

Die Ausbeute der isolierten Proteine Tectin A1 und A2 betrug zwar 2 bis 1o mg an Trockengewicht, doch eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (25) zeigte nur einen Proteinanteil von etwa 1o%. Der Rest bestand aus fein zerriebenem Polyacrylamid, das auch durch hochtouriges Zentrifugieren nicht völlig abgetrennt werden konnte.

Mit diesen Mengen konnte zwar der Nachweis erbracht werden, daß es mit dieser Methode möglich ist, die beiden Proteine Tectin A1 und A2 einzeln zu isolieren, doch reichte das gewonnene Material zu weiteren proteinchemischen Untersuchungen nicht aus.

III/A/3 Isolierung der Tectine A1 und A2 mittels Durchflußelektrophorese im pH3-System

Im pH3-Gelsystem wurde neben der 'slicing'-Methode auch eine präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese im UltraPhor (Colora) durchgeführt, um eine Verwendung von Detergentien zu vermeiden. Die Methode der Durchflußelektrophorese wurde auf Seite 14 eingehend beschrieben.

Das bei der Wellenlänge 254 nm geschriebene Extinktionsdiagramm zeigte nur eine geringe Menge an eluiertem Protein an. Eine grobe Fraktionierung mit anschließender analytischer Kontrolle in dem in Teil II/2/a beschriebenen Gelsystem ließ zwar eine Anreicherung von Tectin A1 zusammen mit Tectin A2 erkennen, nicht dagegen die erhoffte Auftrennung in die Einzelkomponenten. Auch bei diesem Verfahren war die Ausbeute gering: Nur 1o% des eingesetzten Materials konnten wiedergefunden werden.

Das nach dem Lauf gefärbte Gel zeigte auch hier eine sehr intensive Ausfällung von Protein am Start. Interessanterweise wurde aber auch eine Ausfällung von Protein am unteren Ende des Gels, wo das Protein auswandern sollte, nachgewiesen. Dies wurde jedoch nur dann beobachtet, wenn die beiden Tectine die Möglichkeit hatten, aus dem Gel auszuwandern. Die übrigen im Rohpräparat vorhandenen Membranproteine, die schneller als die Tectine wanderten, konnten das Gel ungehindert verlassen.

III/A/4 Isolierung der Tectine A1 und A2 mittels Durchflußelektrophorese im SDS-System

Vorversuche in diesem Gelsystem ergaben, daß die günstigste Trennbedingung bei einer Konzentration von 4% Acrylamid und o.o8% Bis im Gel erreicht wurde. Eine Erhöhung der Acrylamid-Konzentration oder eine stärkere Vernetzung verlängerten die Dauer der elektrophoretischen Trennung erheblich und vergrößerten somit die Gefahr der Luftblasenbildung im Elutionssystem oder die Gefahr der vermehrten Gelschwellung. Eine Verringerung der Acrylamid-Konzentration macht das Gel in seiner Konsistenz zu weich, sodaß es nicht mehr gut in der Gelkammer haftet. Auch Versuche mit Agargelen brachten keine Vorteile.

Die Ionenstärke des Elutionspuffers erwies sich mit der halben, die des Gegenkammerpuffers mit der 1 1/2-fachen Ionenstärke des Gelpuffers am günstigsten. Eine Veränderung der Ionenstärken führt zu einer vermehrten Wölbung der semipermeablen Membran der Elutionskammer und somit zu einer Behinderung des freien Elutionsflusses. Die pH-Werte des Elutions-, Gegenkammer- und Gelpuffers veränderten sich kaum während des Laufes, der pH des Anodenpuffers dagegen sank im Laufe der 24-stündigen Elektrophorese von 7.4 auf 5.4, der pH des Kathodenpuffers stieg von 7.4 auf 9.o.

Eine nach dem Lauf durchgeführte Anfärbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blau zeigte keine anfärbbaren Substanzen im Gel, auch keine Ausfällungen von Protein am oberen oder unteren Ende des Gels.

Da die Auswertung des Extinktionsdiagramms wegen einer - regelmäßig auftretenden - unruhigen Nullinie nicht möglich war, wurde aus jedem zehnten Probegläschen der eluierten Proteine 25o µl Eluat

entnommen und entsprechend den Anweisungen aus Teil II/2/b elektrophoretisch kontrolliert. Man erhält dadurch einen groben Überblick über den Verlauf der präparativen Trennung.

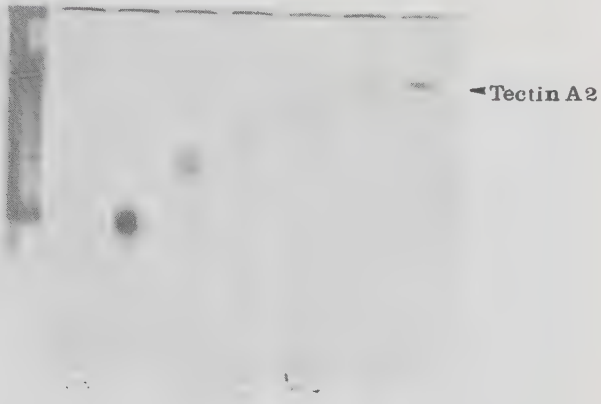


Abb. 4: Gelelektrophorese zur Kontrolle des Trennergebnisses der präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese im SDS-System

Aus jedem zehnten Probeglas der eluierten Proteine wurde eine Probe entnommen und in der analytischen Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.
Die Abbildung zeigt die Auftrennung der Fraktion der wasserlöslichen Membranproteine und gestattet eine Beurteilung der mit dieser Versuchsanordnung erreichten Trennschärfe.
In Gel a ist das unfraktionierte Ausgangsmaterial aufgetragen worden.

Auf diese Weise konnten die Probegläschen geortet werden, welche die Proteine Tectin A1 und A2 enthielten. Um eine Vermischung der beiden isolierten Proteine zu vermeiden, war es nötig, aus jedem der in Frage kommenden Probegläschen nach der oben beschriebenen Methode eine weitere analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese laufen zu lassen.

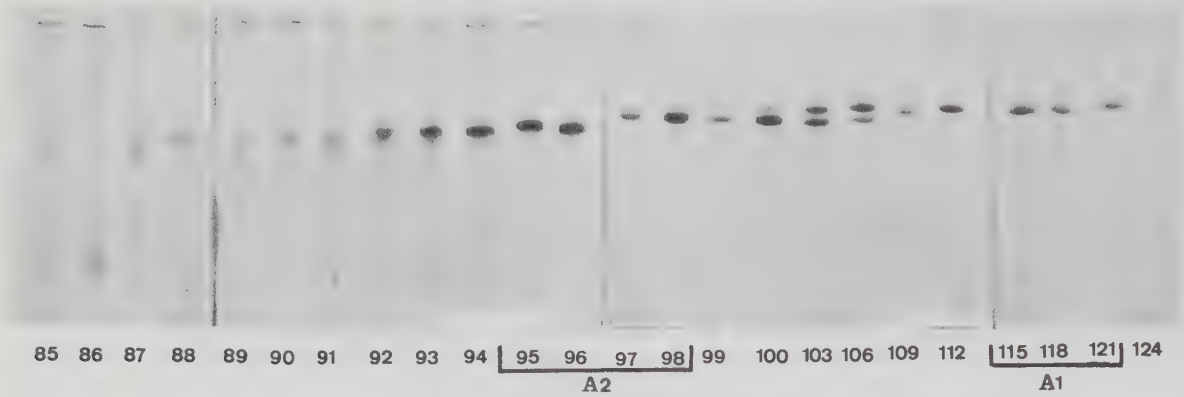
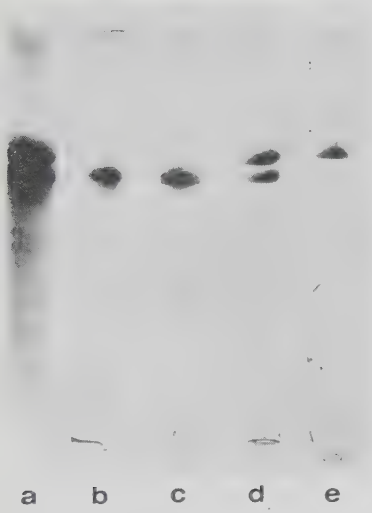


Abb. 5: Gelelektrophorese zur Kontrolle der Trennung der beiden Tectine A1 und A2

Zur Abgrenzung der Probegläschen, in denen die Proteine Tectin A1 und A2 isoliert eluiert waren, wurden aus jedem Glas eine Probe gelelektrophoretisch überprüft.
Die Abbildung zeigt, daß es auf diese Art möglich war, die isolierten Fraktionen von Tectin A1 und A2 zu sammeln und für weitere Untersuchungen vorzubereiten.
Die Zahlen geben die laufende Numerierung der Gläschen an, aus denen Proben entnommen wurden. Die Klammern zeigen den Elutionsbereich an, in dem Tectin A1 bzw. A2 isoliert wurde.

Auf Grund dieser Kontrolle konnten die Tectine A1 und A2 in ihren entsprechenden Probegläschen genau lokalisiert und so unvermischt gesammelt werden.



a) unfraktioniertes Ausgangsmaterial
b) Tectin A2
c) Tectin A2
d) Tectin A2 + Tectin A1
e) Tectin A1

Abb. 6: Gelelektrophorese zur Kontrolle der vereinigten Probegläschen, in denen Tectin A1 und A2 in reiner und in vermischter Form gefunden wurden

Die isolierten Proteine wurden mittels der 'Splitgel'-Technik parallel zum unfraktionierten Ausgangsmaterial im gleichen Gel elektrophoresiert, um ihre Identität mit den Banden Tectin A1 und A2 zu prüfen. Die Abb. 7 zeigt deutlich, daß die beiden Tectine voneinander getrennt werden konnten und identisch mit den Tectinbanden des Ausgangsmaterials wanderten. Die mit der Fraktionierung verbundene Behandlung veränderte das elektrophoretische Verhalten der Tectine nicht.

Abb. 7: Splitgel-Elektrophorese der eluierten Proteine gegen das Ausgangsmaterial

links(l) / rechts(r)
a)Ausgangsmat./Tectin A2
b)Ausgangsmat./Tectin A1
c)Tectin A2/Tectin A1

Tectin A2 ist bei dieser Präparation etwas verunreinigt; dies konnte bei späteren Präparationen vermieden werden.

Die vereinigten Proteinfraktionen wurden dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das durch Gefriertrocknung erhaltene Material wog etwa das fünffache des zur Trennung eingesetzten Proteins. Dies zeigt eine starke Verunreinigung der Tectine durch während der Elektrophorese ebenfalls aus dem Gel auswandernde und nicht durch Dialyse entfernbare Komponenten des Gels. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um mobile Polymerisationsprodukte des Acrylamids, die auch durch eine Vorelektrophorese nicht entfernt werden können.

Der Proteingehalt der gewonnenen Fraktionen wurde näherungsweise aus dem Ergebnis der quantitativen Aminosäure-Analyse der einzelnen Fraktionen berechnet. Danach betrug die Ausbeute pro Präparation etwa o.5 bis 1 mg reines Protein Tectin A1 und A2 sowie 3 bis 5 mg Gemisch von Tectin A1 und A2.

Auch die im Ausgangsmaterial enthaltenen und bei der präparativen Elektrophorese vor den Tectinen A1 und A2 aus dem Gel ausgewanderten Membranproteine wurden fraktioniert und für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

B) Proteinchemische Untersuchungen

III/B/1 Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht der Tectine A1 und A2 wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt.

Als Mittelwert aus sieben Bestimmungen ergab sich für Tectin A1 ein Molekulargewicht von 249 ooo Dalton, für Tectin A2 von225 ooo Dalton. Die Einzelwerte streuten bei Tectin A1 zwischen 235 ooo und 265 ooo Dalton, bei Tectin A2 zwischen 215 ooo und 25o ooo Dalton.

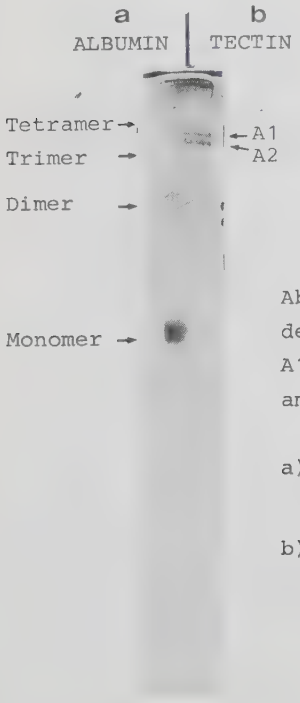
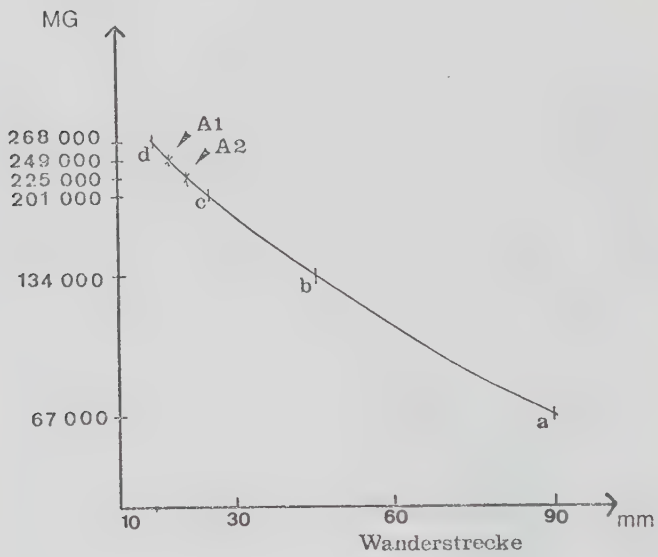


Abb. 8: Splitgel zur Bestimmung des Molekulargewichts von Tectin A1 und A2 durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

a) Rinderalbumin und dessenPolymere als Markersubstanz bekannten Molekulargewichts

b) Proteingemisch mit Tectin A1 und A2

Nach Ausmessen der Wanderstrecken der einzelnen Proteine kann das Molekulargewicht von Tectin A1 und A2 graphisch ermittelt werden:



Auf der logarithmisch unterteilten Ordinate ist das Molekulargewicht eingezeichnet (MG), auf der linear unterteilten Abszisse die Wanderstrecke der Proteine in mm.

a = Albumin- Monomer
b = Albumin- Dimer
c = Albumin- Trimer
d = Albumin- Tetramer
A1 = Tectin A1
A2 = Tectin A2

Das Ergebnis deckt sich im Rahmen der Genauigkeit der Methode mit den von anderen Autoren angegebenen Werten für Tectin A (siehe Tab. 3, Seite 43)

III/B/2 Die Aminosäure-Zusammensetzung von Tectin A1 und A2

Die Aminosäuren wurden im Totalhydrolysat der Proteine mit Hilfe eines automatischen Aminosäure-Analysators bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengestellt:

Tab. 1: Aminosäure-Zusammensetzung von Tectin A1und A2

Aminosäure	Tectin A1	Tectin A2
Asp	1o.4	1o.2
Thr	4.4	4.5
Ser	12.o	1o.7
Glu	18.4	21.o
Pro	2.6	2.5
Gly	11.4	1o.1
Ala	7.9	7.6
Cys	1.o	1.o
Val	3.7	3.9
Met	nicht bestimmbar	
Ile	2.7	2.8
Leu	8.4	8.2
Tyr	o.6	o.8
Phe	2.5	2.4
Lys	7.1	6.7
His	3.o	3.2
Arg	3.9	4.4

Tectin A1 und A2 sind im gleichen präparativen Lauf gewonnen worden. Es handelt sich hier um das 48h-Hydrolysat.

Bei den Angaben sind die Mol-Prozent-Werte eingesetzt worden.

Cystein wurde als Cystein - Säure bestimmt.

Methionin war nicht bestimmbar, doch deutet ein vor Asparaginsäure eluierter peak auf das Vorhandensein von oxidiertem Methionin hin.

Aus der Tabelle 1 geht hervor, daß die Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure - worin allerdings auch Glutamin und Asparagin enthalten sind - vorherrschen; auch die hydrophoben Aminosäuren sind stark vertreten.

Ein Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung der beiden Tectine zeigt eine sehr große Übereinstimmung in den Mol-Prozent-Werten.

III/B/3 Bromcyan-Spaltung der Tectine A1 und A2

Die Bromcyan-Spaltung wurde unternommen, um kleinere Peptide als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zu gewinnen.

Das Reaktionsprodukt war nach 24 Stunden noch nicht völlig gelöst. Die ungelösten Bestandteile wurden abzentrifugiert und konnten auch mit Hilfe von SDS und DTE nicht mehr in Lösung gebracht werden. Es wurde daher nur noch der gelöste Überstand weiterverwendet.

Zur Kontrolle der Spaltung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei zeigte sich zwar ein völliger Abbau der Banden von Tectin A1 und A2, als Spaltungsprodukte konnten aber nur unscharfe Zonen im Molekulargewichtsbereich von 3o ooo bis 9o ooo Dalton identifiziert werden. Im gleichen Bereich war bei den Vergleichsproben keine entsprechende Anfärbung zu sehen (siehe Abb. 1o).

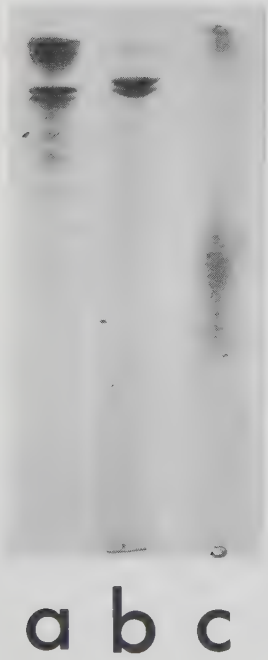


Abb. 1o: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Nachweis der BrCN-Spaltung von Tectin A1 und A2

a) Kontrolle mit nach II/1/b gewonnener Membransuspension

b) Kontrolle mit Gemisch von Tectin A1 und A2

c) BrCN-Spaltung an Tectin A1 und A2: Es zeigen sich hier nur unscharfe Zonen in der Mitte des Gels.

III/B/4 Tryptische Spaltung der Tectine und Trennung der dabei entstandenen Peptide

Die nach der in Teil II/7 beschriebenen Methode gewonnenen Muster der tryptischen Hydrolysate (Fingerprints) sind in Abb. 11 wiedergegeben.

Auffallend ist die geringe Zahl der nach der tryptischen Spaltung auftretenden Peptide. Ein aus einer einzigen Polypeptidkette bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von über 2oo ooo Dalton hätte bei einem Lysin- und Arginin-Anteil von 11% über 1oo von Trypsin angreifbare Spaltstellen und würde demnach eine große Anzahl von Peptiden erwarten lassen.

Auch eine Erhöhung der Enzymkonzentration bis zum Verhältnis Trypsin:Tectin = 1:5 und eine verlängerte Hydrolysendauer ergaben keine Veränderung im Peptidmuster. Das Verbleiben größerer Mengen ungespaltenen Proteins am Start ist unwahrscheinlich, da die Startlinie nicht sehr intensiv angefärbt war.

Auch mit dieser Untersuchungsmethode läßt sich zwischen den beiden Proteinen Tectin A1 und A2 kein signifikanter Unterschied feststellen.

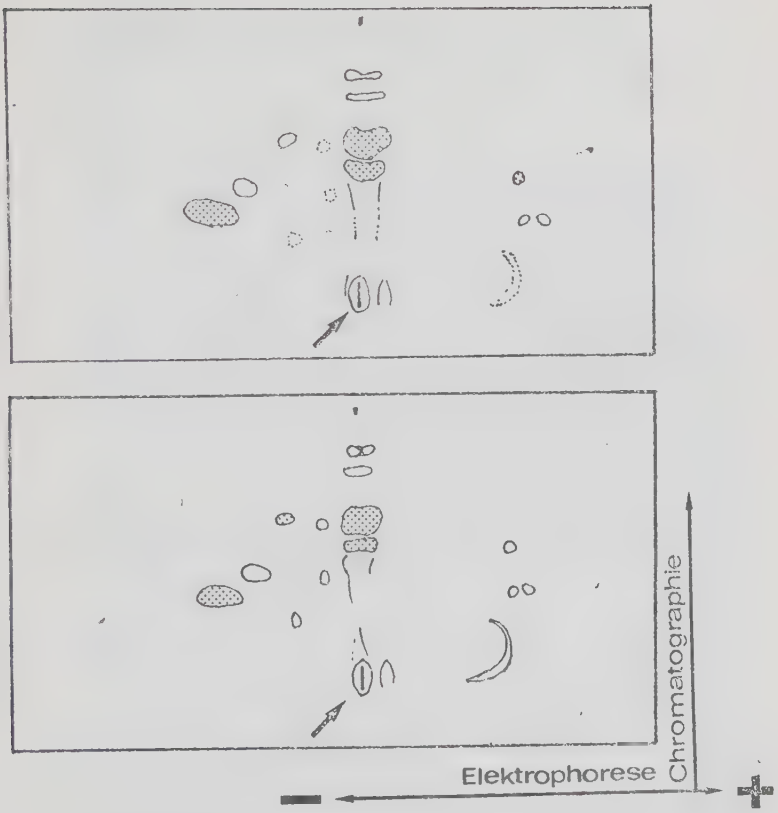


Abb. 11: Tryptische Fingerprints von Tectin A1 (oben) und von Tectin A2 (unten).

Die Peptide wurden an der Startstelle (Pfeil) aufgetragen und in der ersten Richtung (horizontal) durch Elektrophorese (Anode rechts) getrennt. Anschließend wurde zweimal aufsteigend chromatographiert und mit Ninhydrin gefärbt.

Beide Fingerprints weisen nur eine geringe Anzahl von gefärbten Peptiden auf. Der Vergleich der beiden Muster läßt auch hinsichtlich der Lage und der Intensität der Flecke nur geringe Unterschiede erkennen.

III/B/5 Lösungsverhalten von Tectin A1 und A2 und das Auftreten der Doppelbande in der Gelelektrophorese

Das Lösungsverhalten wurde besonders an dem Material studiert, das nach dem in Teil II/1/a beschriebenen Verfahren präpariert worden war.

Um Tectin A1 und A2 ohne Zuhilfenahme von SDS in Lösung zu bekommen, eignet sich am besten ein Gemisch von 3o% Essigsäure, 8 M Harnstoff und 1o% 2-Mercaptoäthanol. Versuche mit 6 M Guanidinhydrochlorid, Ameisensäure, n-Butanol und Chloräthanol zeigten geringeres Lösungsvermögen dieser Stoffe. Erhöhung der Essigsäue-Konzentration auf 6o% führte sogar zu einem Verlust der Doppelbande in der Gelelektrophorese. Ein Verlust ist auch bei Erhitzen auf + 7o°C zu beobachten. Gelegentliches Schütteln während der Inkubation wirkt sich dagegen günstig auf die Löslichkeit aus.

Bei diesen Versuchen nahm das lyophilisierte Material regelmäßig eine gallertige Konsistenz von glasigem Aussehen an und löste sich erst nach längerer Zeit. Zu der völligen Lösung war immer 2-Mercaptoäthanol oder DTE nötig; eine Aufspaltung der Tectine in kleinere Bruchstücke ließ sich durch die Zugabe dieser Substanzen nie beobachten.

Eine ausgesprochen gute Lösungstendenz der Tectine fand sich in einer o.5% Ammoniaklösung. Es fand sich aber kein Polyacrylamid-Gelsystem, um diese gute Löslichkeit für die Präparation nutzen zu können. Die typische Doppelbande der Tectine A1 und A2 konnte entgegen der Mitteilung

von Fuller et al. (8) im basischen Gelsystem nicht reproduziert werden. Auf die Versuche, die gute Löslichkeit in o.5% Ammoniaklösung auch für die Gelfiltration auszunutzen, wurde schon oben (Seite 21) hingewiesen.

Im SDS-Gelsystem fand sich eine gute Lösungstendenz, wenn auch hier die Anwesenheit von 2-Mercaptoäthanol oder DTE nötig ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Clarke (6) wurde durch die Zugabe von 2-Mercaptoäthanol keine Aufspaltung in niedermolekulare Bruchstücke beobachtet.

Die Proteine der Erythrozytenmembran zeigen nur eine geringe Tendenz, sich mit Remazol nach der Methode von Griffith (26) anzufärben. Entsprechende Versuche zeigten, daß sie nach der Färbeprozedur sogar weitgehend unlöslich sind.

Die typische Doppelbande von Tectin A1 und A2 in der Gelelektrophorese war nur entweder in einem SDS-System darzustellen oder in einem sauren, nicht SDS-haltigen System mit einem pH von weniger als 4.5. Im sauren System war aber regelmäßig Proteinmaterial am Start ausgefallen - unter bestimmten Umständen sogar am Gel-Ende, siehe Seite 24 -, was im SDS-System nur bei ungenügender Zugabe von DTE oder 2-Mercaptoäthanol zu beobachten war (Siehe auch Abb. 13).

IV Diskussion

Die Untersuchungen über Tectin A1 und A2 wurden mit Material durchgeführt, das mittels einer präparativen Gelelektrophorese in einem SDS-haltigen System gewonnen wurde. Um die in dieser Arbeit über die Tectine A1 und A2 beschriebenen Aussagen mit den in der Literatur vorliegenden proteinchemischen Untersuchungsergebnissen zu vergleichen, ist es zunächst nötig, den Einfluß von SDS auf die hier durchgeführten Untersuchungen zu kennen.

Hierfür boten sich Vergleichsversuche mit Pferde-Cytochrom C an. Cytochrom C eignet sich für diese Versuche besonders gut, da die Primärstruktur und damit gleichzeitig die Aminosäure-Zusammensetzung bekannt sind. Auch die Bedingung zur Herstellung der tryptischen Fingerprints sind erprobt (27) und wurden in gleicher Weise für die tryptische Spaltung von Tectin A1 und A2 angewandt. Es wurde dabei in Kauf genommen, daß es sich beim Cytochrom C im Gegensatz zu den isolierten Tectinen A1 und A2 um ein kleines, gut wasserlösliches und basisches Molekül handelt.

Das Cytochrom C vom Pferd wurde identisch zu den Tectinen behandelt: Inkubation über 2 Stunden bei 37°C im Puffersystem: o.o1 M Tris, o.oo1 M EDTA, 2 M Harnstoff, o.o4 M DTE, 1% SDS pH 8; Dialyse über 5 Tage gegen H_2O (mit NH_3 auf pH 9 eingestellt) und anschließender Lyophilisation.

Wie die Tabelle 2 zeigt, beeinträchtigt die Gegenwart von SDS das Ergebnis der quantitativen Aminosäure-Analyse kaum.

Tab. 2: Vergleich der Aminosäure-Zusammensetzung von
(Spalte A): Cytochrom C
(Spalte B): Cytochrom C, SDS behandelt
(Spalte C): Cytochrom C, Literaturwert (28)

Aminosäure	A	B	C
Asp	9.5	9.5	7.8
Thr	9.3	9.o	9.7
Ser	o	2.4	o
Glu	14.6	14.2	11.6
Pro	3.9	4.o	3.9
Gly	11.7	12.o	11.6
Ala	6.2	6.o	5.8
Cys	o.9	o	1.9
Val	2.7	2.6	2.9
Met	1.3	1.7	1.9
Ile	5.1	5.2	5.8
Leu	5.4	5.7	5.8
Tyr	3.6	2.8	3.9
Phe	3.6	3.1	3.9
Lys	17.5	16.6	18.4
His	2.7	3.1	2.9
Arg	1.9	2.1	1.9

Sämtliche Angaben in Mol-Prozenten.

Dagegen war, wie Abbildung 12 zeigt, das für Cytochrom C typische Fingerprintmuster der tryptischen Peptide mit dem Muster des Cytochrom C, das vorher mit SDS behandelt wurde, nicht identisch. Es traten weniger Bruchstücke auf und diese Oligopeptide waren in ihren elektrophoretischen und chromatographischen Eigenschaften stark verändert. Für die durch SDS

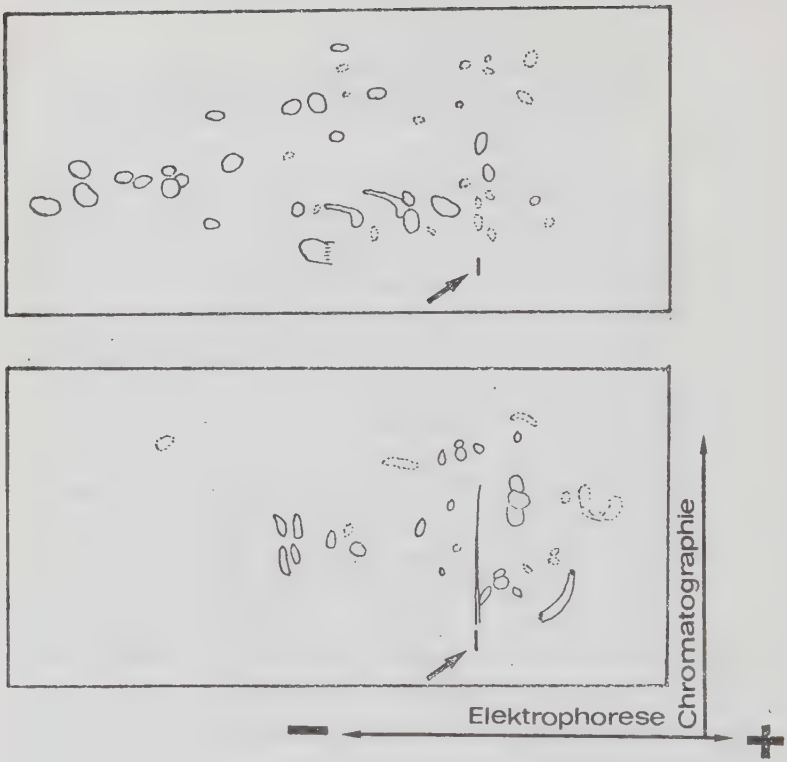


Abb. 12: Tryptisches Fingerprintmuster von Cytochrom C (oben) und von SDS-behandeltem Cytochrom C (unten)

Das tryptische Fingerprintmuster von Cytochrom C entspricht dem in der Literatur beschriebenem Muster (27). Im Vergleich hierzu zeigt das tryptische Fingerprintmuster von SDS-behandeltem Cytochrom C, das unter identischen Bedingungen hergestellt wurde, erhebliche Abweichungen. Es wurden weniger Peptide abgespalten, die überdies in ihren elektrophoretischen und chromatographischen Eigenschaften stark verändert waren.

Der Pfeil kennzeichnet die Startstelle.

bedingte Verminderung der Spaltbarkeit bieten sich zwei Deutungen an: - Die Struktur von Proteinen wird durch die Gegenwart von SDS so stark verändert (29), daß das Trypsin nicht mehr an allen auf Grund der Aminosäure-Sequenz an sich möglichen Spaltungsstellen wirken kann. - Durch das an Protein angelagerte SDS wird auch das Trypsin in seiner eigenen Konformation verändert, sodaß es an enzymatischer Aktivität einbüßt.

Das Ergebnis dieser Untersuchung beweist, daß SDS sicher Einfluß auf die tryptische Spaltung hat. Die Muster der tryptischen Peptide der Tectine A1 und A2 sind daher zwar untereinander vergleichbar, da beide Proteine unter identischen Bedingungen gewonnen wurden, sie lassen aber keine Aussagen über die Zahl der spaltbaren Stellen in den Peptidketten zu. Damit kann die Frage, ob die Tectine aus jeweils einer einzigen Polypeptidkette oder aus mehreren möglicherweise identischen Untereinheiten bestehen, nicht sicher entschieden werden.

An dieser Stelle soll nochmals auf das Vorhandensein von Fremdmaterial nach der präparativen Gelelektrophorese im SDS-System hingewiesen werden: Das nach der Präparation erhaltene gefriergetrocknete Material wog fünf- bis zehnmal so viel wie die zur Trennung eingesetzte Proteinmenge.

Sämtliche Versuche, dieses überschüssige Material zu analysieren, führten nicht zum Erfolg. Dem UV-Spektrum nach ist es keiner Substanz ähnlich,die während der Präparation eingesetzt wurde. Ein unverhältnismäßig hoher Ammoniak-peak im Aminosäure-Analyse-Diagramm läßt allerdings die Vermutung zu, daß es

sich hier um vernetztes, durch Dialyse nicht völlig entferntes Polyacrylamid handelt. Auch bei einer zur Kontrolle des Verfahrens unter identischen Bedingungen, aber ohne Protein durchgeführten Gelelektrophorese fiel während der Dialyse ein Teil des eluierten Polyacrylamids aus.

Der Einfluß dieses Fremdmaterials auf die proteinchemischen Untersuchungen ist aber sicher nur von untergeordneter Bedeutung. Jedenfalls wurde die Trennbarkeit der Tectine in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese dadurch nicht beeinflußt, ebenso nicht die Aminosäure-Analyse.

Vergleicht man die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse mit den Mitteilungen anderer Autoren über Tectin A1 und A2, so zeigt sich bei der Angabe des Molekulargewichts die größte Übereinstimmung:

Tab. 3: Vergleich der bisher für Tectin A1 und A2 angegebenen Molekulargewichte
Die Zahlen in Klammern geben die zitierte Literaturstelle an.

Tectin A_2	Tectin A_1	
240 000	255 000	(10)
200 000	220 000	(12)
220 000	240 000	(6)
200 - 240 000	220 - 255 000	(7)
220 000	240 000	(13)
210 000	223 000	(9)
225 000	249 000	eigene Angaben

Bei einem Vergleich der bisherigen Angaben über die Aminosäure-Zusammensetzung der Tectine mit den hier vorgelegten Ergebnissen lassen sich einige Unterschiede erkennen, besonders bei den Angaben über die Häufigkeit von Serin und Glycin.

Tab. 4: Vergleich der bisher über Tectin A1 und A2 angegebenen Aminosäure-Zusammensetzung (in Mol-Prozent)

Aminosäure	A	B	C	D	E
Asp	1o.9	1o.o	9.7	11.7	1o.3
Thr	3.6	4.8	5.7	5.5	4.5
Ser	4.1	5.7	7.2	9.1	11.3
Glu	2o.5	16.1	16.2	22.o	19.7
Pro	2.4	3.9	4.5	2.1	2.5
Gly	4.9	5.8	6.3	8.2	1o.8
Ala	9.2	8.5	7.3	8.8	7.8
Cys	1.1	o.9	1.2	/	1.o
Val	4.7	5.3	6.5	4.2	3.8
Met	1.7	2.1	1.9	o.6	/
Ile	4.o	4.2	4.1	3.6	2.8
Leu	12.4	12.1	9.8	12.2	8.3
Tyr	2.o	2.6	2.7	1.4	o.7
Phe	3.o	3.7	3.5	4.9	2.5
Lys	6.7	6.o	5.8	/	6.9
His	2.6	2.7	2.1	2.9	3.o
Arg	5.8	5.9	5.1	5.5	4.3

A = Spectrin (5)
B = wasserlösliche, bei pH 4.5 ausfällbare Erythrozyten-Membranproteine, in denen Tectin A1 und A2 angereichert vorhanden sind (14)
C = wasserlösliche Erythrozyten-Membranproteine, in denen Tectin A1 und A2 angereichert vorhanden sind (1)
D = Tectin A1 und A2 nach der 'slicing'-Methode gewonnen (8)
E = Die in dieser Arbeit vorgelegten Werte für Tectin A1 und A2

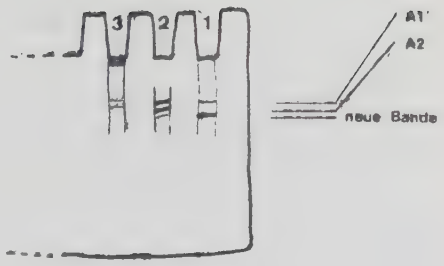
In D und E wurde das arithmetische Mittel aus den Bestimmungen der einzelnen Tectine A1 und A2 genommen, um die Angaben mit den übrigen Werten vergleichen zu können.

Viel Interesse wird in der Literatur auf die Frage verwendet, ob die Tectine A1 und A2 aus Untereinheiten aufgebaut sind (15, 3o, 31) oder ob es sich hier um zwei 'Riesenmoleküle' handelt (7, 12, 32). Eine Zerlegung in Untereinheiten wurde des öfteren beschrieben (6, 32). Selbst die Zusammenlagerung kleinerer Proteine zu Aggregaten mit den charakteristischen Eigenschaften der Tectine A1 und A2, nämlich die typische Doppelbande in der SDS-Gelelektrophorese und hohes Molekulargewicht, wurde berichtet (3o). Die Abbauerscheinungen erklärte Clarke mit einem vermuteten autoproteolytischen Abbau (6). Eine endogene proteolytische Aktivität in der Protein-Fraktion der Erythrozytenmembran wurde von Hulla nachgewiesen (32).

Die eigenen Erfahrungen zeigten keine Veränderung des gelelektrophoretischen Verhaltens, solange die Proteine als Suspension oder als Lyophilisat bei -17° C aufbewahrt wurden. Wurde dagegen eine Suspension von wasserlöslichen Membranproteinen länger als 1o Stunden bei 2o° oder 37°C gelagert, so ließ sich regelmäßig ein Abbau der Tectinbanden zugunsten einer neuen Bande mit einem entsprechenden Molekulargewicht von etwa 2oo ooo Dalton nachweisen. In Abb. 13 ist der Abbau von Tectin A1 und A2 durch Lagerung einer Suspension über 3 Wochen bei + 4°C dargestellt. Die Abbauerscheinungen nahmen allerdings selten ein so intensives Ausmaß wie in Abb. 13 gezeigt an.

Durch die Inkubation von Tectin A1 und A2 in Gegenwart von SDS konnte der Zerfall in kleinere Einheiten weitgehend vermieden werden. Ausnahmen hierzu waren meistens auf eine ungenügende Inkubationsdauer zurückzuführen.

Abb. 13:
Abbau der Tectine A1 und A2 während Lagerung bei +4°C



In einem Gelblock mit mehreren Auftragetaschen wurde nach den Bedingungen von II/2/b folgende Lösungen aufgetragen:

1) Eine Suspension wasserlöslicher Membranproteine nach II/1/b wurde 21 Tage bei + 4°C aufbewahrt und dann im SDS-System gelelektrophoretisch überprüft.
   Die Bande des Tectin A2 ist fast völlig zugunsten einer neuen Bande mit einem Molekulargewicht von 2oo ooo Dalton verschwunden.
2) Zum Vergleich wurde eine frisch inkubierte Proteinlösung, das aus der gleichen Präparation stammte, aufgetragen.
   Die Banden der Tectine sind regelmäßig ausgebildet, die kleinere Bande mit dem Molekulargewicht 2oo ooo nur schwach ausgeprägt.
3) Die Proteinlösung in 3 wurde wie die Lösung in 2 behandelt, bei der Inkubation wurde allerdings kein DTE zugegeben.
   Es war deutlich zu sehen, daß die Banden schwächer als in 2 ausgeprägt waren; dafür ist aber Protein an der Startstelle ausgefallen.

Um den Abbau in niedermolekulare Anteile systematisch zu untersuchen, wurde eine Suspension der nach II/1/b hergestellten Membranproteine bei + 2o° C aufbewahrt. Alle 4 Tage wurde eine gleichgroße Probe entnommen und bei - 17° C eingefroren. Nach 4 Wochen wurden sämtliche Proben gleichzeitig aufgetaut, in SDS inkubiert und nach II/s/a elektrophoretisch

überprüft. Abb. 14 zeigt diese Gele nach der Anfärbung. Man erkennt am Ausgangsmaterial das Vorherrschen von Tectin A1 und A2, das aber bei der zweiten Probeentnahme nach 4 Tagen schon fast verschwunden ist. Dafür trat eine neue Bande mit einem Molekulargewicht 2oo ooo verstärkt auf. Nach 21 Tagen waren die Banden der hochmolekularen Proteine praktisch völlig zugunsten der Banden kleinerer neu entstandener Proteine, deren Molekulargewicht bei ca. 4o ooo Dalton lag, abgebaut.

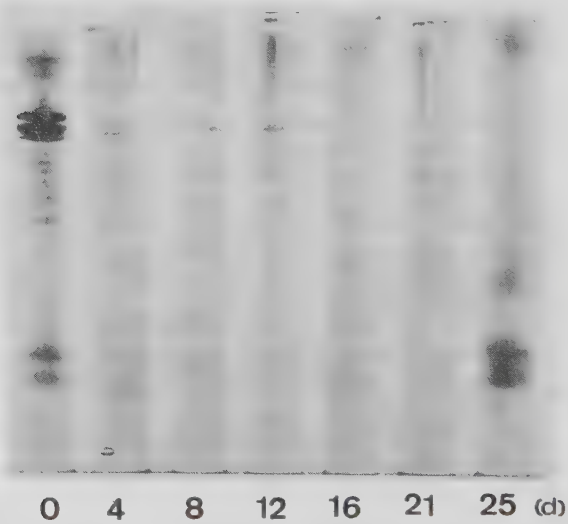


Abb. 14: Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Nachweis von Abbauvorgängen an Tectin A1 und A2, die durch Lagerung bei + 2o° C hervorgerufen waren.

Die Zahlen unter den Gelen geben die Tage bis zur Probenentnahme an.

Man erkennt den raschen Abbau der Tectin-Banden zu Banden, die einem Molekulargewicht von 4o ooo bis 9o ooo Dalton entsprechen. Dabei herrschen bestimmte Proteine vor. Die Bande mit dem Molekulargewicht 2oo ooo war nach einigen Tagen selbst einem Abbau unterworfen.

Zu diskutieren ist hier, ob es sich um Autoproteolyse handelt, wobei zu bemerken ist, daß das Bandenmuster Ähnlichkeiten mit demjenigen zeigt, welches Steck et al. (33) nach tryptischen Verdauungsversuchen an Erythrozyten-Membranproteinen erhalten hatten. Es muß aber auch an einen Abbau durch Bakterien gedacht werden, wofür die Verringerung der Färbeintensität der Banden spricht. Gegen einen Abbau durch Bakterien ist einzuwenden, daß der Abbau der Proteine zu wohldefinierten Banden führte und nicht zu unscharfen Zonen, wie sie bei bakterieller Einwirkung eher zu erwarten gewesen wären.

Ein weiterer Hinweis dafür, daß die Tectine A1 und A2 aus kleineren Proteinen aufgebaut sein könnten, ist aus dem Ergebnis der tryptischen Fingerprints zu gewinnen: Bei der errechneten theoretischen Zahl von 1oo möglichen Spaltungspunkten für das Trypsin an einem "Riesenmolekül' mit einem Molekulargewicht von über 2oo ooo und einem Mol-Prozent-Anteil an Lysin und Arginin von 11% ist das Ergebnis mit nur 16 abgespaltenen Peptiden doch recht erstaunlich. Nimmt man dagegen den Aufbau von Tectin A1 und A2 aus kleineren, womöglich identischen Untereinheiten an, so würde die kleine Zahl der Spaltprodukte nicht so verwundern.

Ob die Tectine A1 und A2 tatsächlich aus Untereinheiten aufgebaut sind, oder ob es sich bei ihnen um Moleküle handelt, die aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen, läßt sich auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit aber nicht entscheiden.

Auf Grund der bisher in der Literatur vorliegenden Befunde ließ sich vermuten, daß zwischen den beiden Tectinen A1 und A2 größere Unterschiede bestehen. Hingewiesen wurde auf die voneinander abweichenden Molekulargewichte (3, 9, 1o, 11, 12, 13), auf die unterschiedliche Phosphorylierbarkeit von Tectin A1 und A2 (13, 34, 35, 36, 37) sowie auf die Möglichkeit, Tectin A2 durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese in drei Banden zu zerlegen, während A1 unter diesen Bedingungen einheitlich wandert.

Nach dem Erfolg der hier erstmals beschriebenen Trennungsversuche mittels der präparativen Gelelektrophorese war es möglich, die Proteine Tectin A1 und A2 einzeln zu untersuchen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Unterschiede zwischen den beiden Proteinen geringer sind, als nach den bisherigen Ergebnissen zu erwarten war: Es besteht kein großer Unterschied in der Aminosäure-Zusammensetzung der Tectine A1 und A2, ebensowenig ist ein signifikanter Unterschied in den tryptischen Fingerprintmustern zu erkennen.

Die Befunde lassen vermuten, daß die beiden Tectine aus ähnlichen, möglicherweise identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Diese Untereinheiten könnten kovalent miteinander verbunden sein, etwa über Isopeptidbindungen zwischen Lysin- und Glutaminsäure-Resten. Derartige Bindungen wurden von Birckbichler et al. (38) in der Plasmamembran und im endoplasmatischen Retikulum von Mäuse-Fibroblasten nachgewiesen. Wenn auch Fuller et al. (8) diese Isopeptidbindungen im Tectin nicht finden konnten, so spricht doch ihr Nachweis von 3 vorhandenen N-terminalen Gruppen für den Aufbau des Tectins aus mehreren Einheiten. Damit könnte die starke Ähnlichkeit der Tectine A1 und A2 hinsichtlich der Aminosäure-Zusammensetzung und des tryptischen Fingerprintmusters eine Erklärung finden.

Eine endgültige Klärung der Struktur dieser Membranproteine bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

V Zusammenfassung

Die Fraktion der wasserlöslichen Membranproteine aus menschlichen Erythrozyten enthält zwei Proteine, die bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit von Natrium-Dodecyl-Sulfat eine charakteristische Doppelbande bilden, die dem Molekulargewicht 225 ooo und 249 ooo Dalton entsprechen.

Diese beiden Proteine sollten von den übrigen Membranproteinen getrennt werden und einzeln dargestellt werden. Die Gelfiltration in ammoniakalischer Lösung brachte keinen Erfolg. Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophoresen nach dem Prinzip der 'slicing'-Methode und dem Prinzip der Durchflußelektrophorese in einem System 3o% Essigsäure, 6 M Harnstoff, pH 3 führten zu einer Trennung der Proteine, allerdings in für proteinchemische Untersuchungen zu geringen Mengen. Gute Ergebnisse wurden in einer präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Prinzip der Durchflußelektrophorese in einem System o.o4 M Tris, o.o2 M Na-Acetat, 1% Natrium-Dodecylsulfat bei pH 7.4 erreicht mit Ausbeuten von etwa 1 mg reines Protein pro Präparation.

Das Molekulargewicht deckt sich mit den in der Literatur erhältlichen Angaben. Die Aminosäure-Zusammensetzung der beiden Proteine ist sehr ähnlich. Auch das Verteilungsmuster der tryptisch abgespaltenen Peptide beider Proteine ist fast identisch. Die Bromcyan-Spaltung führte zum völligen Abbau in kleinere Bruchstücke.

Es wurden Vergleichsversuche an Cytochrom C unternommen, um den Einfluß von Natrium-Dodecyl-Sulfat auf die proteinchemischen Untersuchungen beurteilen zu können.

VI Literaturübersicht

1) D. Mazia und A. Ruby
Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 1oo5 (1968)

2) J. Th. Hoogeveen, R. Juliano, J. Coleman und A. Rothstein
J. Mem. Biol. 3, 156 (197o)

3) G. Fairbanks, Th. L. Steck und D. F. H. Wallach
Biochemistry 1o, 26o6 (1971)

4) V. T. Marchesi und E. Steers jr.
Science 159, 2o3 (1968)

5) S. L. Marchesi, E. Steers, V. T. Marchesi und T. W. Tillack
Biochemistry 9, 5o (197o)

6) M. Clarke
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1o63 (1971)

7) F. W. Hulla und W. B. Gratzer
FEBS Letters 25, 275 (1972)

8) G. M. Fuller, J. M. Boughter und M. Morazzani
Biochemistry 13, 3o36 (1974)

9) V. Anselstetter
'Entwicklung eines Verfahrens der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine und Glykoproteine der Zytoplasmamembran, erarbeitet am Erythrozyten des Menschen'
Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg (1974)

10) J. Lenard
Biochemistry 9, 1129 (1970)

11) J. T. Gwynne und Ch. Tanford
J. Biol. Chem. 245, 3269 (1970)

12) H. R. Trayer, Y. Nozaki, J. A. Reynolds und Ch. Tanford
J. Biol. Chem. 246, 4485 (1971)

13) R. O. Williams
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 671 (1972)

14) H. Hamaguchi und H. Cleve
Biochim. Biophys. Acta 233, 320 (1971)

15) A. H. Maddy und M. J. Dunn
'Protides of the Biological Fluids', Band XXI, Pergamon Press, Oxford (1974)

16) T. W. Tillack, S. L. Marchesi, V. T. Marchesi und E. Steers jr.
Biochim. Biophys. Acta 200, 125 (1970)

17) Th. L. Steck
'Membrane Research', S.71, Academic Press, New York - London (1972)

18) J. T. Dodge, C. Mitchell und D. J. Hanahan
Arch. Biochem. Biophys. 100, 119 (1963)

19) Colora UltraPhor
'Apparat für analytische und präparative Gelelektrophoresen', Gerätebeschreibung und Bedienungsanleitung, Ausgabe 1972, Colora Meßtechnik GmbH, Lorch

2o) H. R. Maurer
'Disk - Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese', S. 111 , Walter de Gruyter & Co., Berlin (1968)

21) K. Weber und M. Osborn
J. Biol. Chem. 244, 44o6 (1969)

22) E. Steers jr., G. R. Craven und Ch. B. Anfinsen
J. Biol. Chem. 24o, 2478 (1965)

23) H. J. Horstmann und L. Gürtler
Hoppe-Seyler's Z Physiol. Chem 349, 41o (1968)

24) R. Busse und H. J. Horstmann
unveröffentlichte Ergebnisse

25) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

26) I. P. Griffith
Analytical Biochemistry 46, 4o2 (1972)

27) L. Gürtler und H. J. Horstmann
FEBS Letters 18, 1o6 (1971)

28) E. Margoliash, J. R. Kimmel, R. L. Hill und W. R. Schmidt
J. Biol. Chem. 237, 2148 (1962)

29) Ch. Tanford
'The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes', Verlag John Wiley & Sons, New York (1973)

3o) M. J. Dunn und A. H. Maddy
FEBS Letters 36, 79 (1973)

31) T. C. Bøg-Hansen und O. J. Bjerrum
'Protides of the Biological Fluids', Band XXI,
S. 39, Pergamon Press, Oxford (1974)

32) F. W. Hulla
Biochim. Biophys. Acta 345, 43o (1974)

33) Th. L. Steck, G. Fairbanks und D. F. H. Wallach
Biochemistry 1o, 2618 (1971)

34) F. B. St. C. Palmer und J. A. Verpoorte
Can. J. Biochem. 49, 337 (1971)

35) A. D. Roses und St. H. Appel
J. Biol. Chem. 248, 14o8 (1973)

36) Ch. S. Rubin und O. M. Rosen
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5o, 421 (1973)

37) C. E. Guthrow, J. E. Allen und H. Rasmussen
J. Biol. Chem. 247, 8145 (1972)

38) P. J. Birckbichler, R. M. Dowben, S. Matatic
und A. G. Loewy
Biochim. Biophys. Acta 291, 149 (1973)

Lebenslauf

Am 13. Juli 1947 wurde ich als dritter Sohn des Zoologen Dr. Harry Hirschfelder und seiner Ehefrau Hedwig, geborene Reichhelm, in Erlangen geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule in Erlangen und wechselte dann in das Marie-Therese-Gymnasium (Neusprachliches Gymnasium) in Erlangen über. An diesem Gymnasium beendete ich die Schule im Juli 1966 mit dem Abitur.

Von 1966 bis 1968 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Seit dem Wintersemester 1968 studierte ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen Medizin. Nach dem Vorphysikum im Sommersemester 1969 und dem Physikum im Wintersemester 1971 schloß ich das Studium der Medizin nach dem Sommersemester 1974 mit dem Staatsexamen ab.

Am 22. November 1974 heiratete ich Frl. Ursula Kröncke.

Herrn Professor Dr. W. Kersten danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.
Für die Anregungen, Diskussionen und die stets großzügig gewährte Hilfe danke ich Herrn Professor Dr. H.-J. Horstmann sehr herzlich.

Buchdruck — Offsetdruck
Karl Döres · Erlangen, Jägerstr. 3